(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106872713 A
(43)申请公布日 2017.06.20

(21)申请号 201611271198.2

(22)申请日 2016.12.27

(71)申请人 许洋
地址 100062 北京市东城区东兴隆街56号A-538

(72)发明人 不公告发明人

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

(54)发明名称

一种微量蛋白质原位检测的免疫质谱试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明涉及微量蛋白质原位检测的免疫质谱试剂盒及制备方法，属于蛋白质检测技术领域，该试剂盒包括一小管含^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)的标准品；一小管含抗标志物抗体的磁珠；一小管缓冲液；一小管洗脱液；一小管能量吸收分子饱和溶液，上述各小管置于4℃冷藏盒中。本发明可用于体外样品检测和预后判断的免疫质谱试剂盒。本方法可以对交互作用的修饰蛋白质组的动态变化进行实时检测。

CN 106872713 A

1.一种用于微量蛋白质原位检测的免疫质谱试剂盒的标准品，其特征在于，被合成的标准品为含^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)，标准品的分子量为比非标记的内源性环形多肽(Fc-III)多了6Da；所述标准品的化学结构为：D C A W H $L^{(C14、H2)}$G E $L^{(C14、H2)}$V W C T。

2.如权利要求1所述的标准品，用于免疫质谱试剂盒中的质量控制。

一种微量蛋白质原位检测的免疫质谱试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于微量蛋白质原位检测的免疫质谱分析的标准品，其特征是采用^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)替代Protein A/Protein G，然后用质谱法对样品中已被特异性抗体捕获的标志物进行精确地鉴别、实时检测。

背景技术

[0002] 不论是细胞的正常功能还是病理特性都在一定程度上取决于细胞所表达的蛋白质功能。因此，鉴定人体内表达的蛋白质的区别，可用于体外疾病样本的筛查，并最终用于药物开发和疾病治疗。而要进行蛋白质表达和功能的差异化分析，要求能够达到分辨细胞内分子的复杂混合物的程度。但细胞内许多物质往往以微量存在，目前用于分析蛋白的方法在上述各方面都有局限，用这些常规手段难以进行化学结构及蛋白质序列鉴定分析；用抗体-质谱联合可克服这一技术缺点。

[0003] 目前，在蛋白质功能研究上常用的方法是免疫沉淀。绝大部分免疫沉淀方法是基于Protein A/Protein G和抗体的特异结合。目前Protein A/Protein G的生产基本被几家美国公司所垄断。近十年来，化学生物学的发展为生物医学的研究提供了许多新的工具和技术。我们前期的工作发现了一个环形多肽(Fc-III)和抗体有很强的亲和性，可以被用来纯化抗体。Fc-III的序列是DCAWHLGELVWCT-NH2，它是在小分子环肽库中通过噬菌体展示(phage display)的方法筛选出来的，它能够特异性地与IgG分子Fc片段的铰链区相结合。结构生物学的证据显示，化学合成的Fc-III与IgG的Fc片段结合时呈β发卡的构型，其中的两个Cys残基之间形成了二硫键；Fc-III通过盐桥、氢键、疏水相互作用等多种作用力与Fc片段结合。Fc-III足可以模拟Protein A或G，起到替代的效果。Fc-III能从血清或唾液中分离纯化抗体；利用分子生物学的手段将Fc-III融合表达在蛋白上，可以使用IgG的凝胶颗粒、甚至是原核表达的IgG-Fc的凝胶颗粒进行蛋白纯化的工作。实验表明，这种蛋白纯化的手段具有特异性高、成本低等优势，具有很大的应用前景。本专利拟发展一个以合成^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)为基础的分离纯化抗体的技术，实现免疫共沉淀的灵敏度和重现性；并发展集成化的分析系统使得这个技术能被广泛地用于分子生物学的研究中。

[0004] 举例，传统用于胰岛素检测试剂盒及制备方法为ELISA等传统免疫分析技术，ELISA等传统免疫分析技术主要依靠间接的化学或放射测定法。举例讲，胰岛素的检测试剂盒制备方法为先将抗胰岛素抗体(第一个抗体)结合至固相表面(如玻璃)，然后将含胰岛素的样品(如血清)，加至这个已标有抗胰岛素抗体的容器中；这样，胰岛素就会结合至抗体上，然后洗脱未结合的物质；再加上已标有酶、放射性或化学发光性的抗胰岛素抗体(第二个抗体)，这样就可以检测出胰岛素的总含量。这种方法学的缺点是无法测出标志物，如胰岛素，的单个氨基酸变异(如胰岛素的N或C端丢失了一个或数个氨基酸，胰岛素被甲基，酰基等修饰，胰岛素的异构体)；即通常被用于传统检测胰岛素试验是检测所谓的总胰岛素量。

[0005] 因为传统胰岛素检测常常是针对病人胰岛素总体水平，无法直接鉴定变异性标志物，如内源性胰岛素与外源性胰岛素水平，这样就增加了胰岛素个体化活性水平控制的难度。

[0006] 目前，在进行蛋白质质谱分析时还没有发现一个用于临床直接鉴定内源性胰岛素与外源性胰岛素检测的、采用^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)替代Protein A/Protein G的标准化免疫质谱试剂盒。

发明内容

[0007] 本发明的目的是克服已有技术的不足之处，提出一种用于检测内源性胰岛素与外源性胰岛素为案例的、采用^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)替代Protein A/Protein G的免疫质谱试剂盒及制备方法。

[0008] 本发明涉及微量蛋白质原位检测的免疫质谱试剂盒及制备方法，其特征在于，该试剂盒包括：

[0009] 一小管含^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)的标准品，10～30μl；

[0010] 一小管含抗胰岛素抗体的、用^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)标记磁珠，30～50μl；

[0011] 一小管缓冲液，300～500μl，该缓冲液为50～100mM PBS，pH值为7.0～8.0；

[0012] 一小管洗脱液，10～50μl，该洗脱液为1～5％三氟乙酸的水溶液；

[0013] 一小管能量吸收分子饱和溶液，5～10μl，该溶液由能量吸收分子溶解在含30～60％乙腈和0.5～1％三氟乙酸的水溶液中构成，该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种；上述各小管置于4℃冷藏盒中。

[0014] 本发明提出的上述免疫质谱试剂盒制备方法，其特征在于，该方法包括以下步骤：

[0015] 1)含环形多肽(Fc-III)的标准品的制备：

[0016] 用重组DNA技术，将载环形多肽(Fc-III)的基因系列寡核苷酸注入大肠杆菌内，合成时，加入^{14}C、^{2}H同位素-亮氨酸，使合成的环形多肽(Fc-III)带有^{14}C、^{2}H双标记的同位素；用质谱测试^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)的标准品分子量为比非标记的内源性环形多肽(Fc-III)多了6Da；所述^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)其化学结构为：D C A W H $L^{(C14、H2)}$ G E $L^{(C14、H2)}$ V W C T

[0017] 注：链中6、9位合成中加入了同位素^{14}C、^{2}H双标记-亮氨酸($L^{(C14、H2)}$)。

[0018] 2)制备含抗胰岛素抗体的磁珠：基质是任何能与抗体选择性或特异性结合的物质。举例说明，含^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)可选择性或特异性结合抗体的Fc位点。洗去基质未吸附的物质；用Carbodiimide方法(Carbodiimide Method)将带有羧酸基团标记的磁性珠上基质与抗胰岛素抗体的氨基基团结合(Gunn DL,et aI.Preparation of sensitive and stable erythrocytes by the carbodiimide method for the detection of primary and secondary IgM and IgG antibody.J ImmunoI Methods.1972;1(4):381-389.)，或用streptavidin标记的磁性珠上基质与biotin标记的抗胰岛素抗体结合；置磁性处理器上，15～25℃孵育20～40分钟，除去液体；

[0019] 3)配制50～100mM PBS(Phosphate-Buffered Saline)，pH值为7.0～8.0缓冲液、配制1～5％三氟乙酸的洗脱液，分别分装成300～500μl小管和10～50μl小管；

[0020] 4)将能量吸收分子溶解于30～60％乙腈和0.5～1％三氟乙酸的水溶液中，制成能量吸收分子饱和溶液，并分装成5～10μl小管，该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种；

[0021] 5)将上述分装好的各小管置于4℃冷藏箱中。

[0022] 免疫质谱试剂盒检测的应用实验步骤包括：

[0023] 1.稀释：将生物样品先用缓冲液稀释30～50倍，将样品充分混匀；

[0024] 2.结合：将上述标本100μl加至标有特异性抗体的磁珠的PCR管中，置磁性处理器上，15～25℃孵育20～40分钟，除去液体；

[0025] 3.洗去非特异结合：加100μl缓冲液至已装好磁珠的PCR管，置磁性处理器上孵育1～5分钟，除去液体，重复上述操作两次；

[0026] 4.洗脱：加10μl洗脱液1～5分钟，洗脱标本至上清液；

[0027] 5.离子化：取5μl上清液移至另一个PCR管中，加入5μl能量吸收分子饱和溶液充分混匀；

[0028] 6.取1μl混合溶液加样至质谱专用金属片(有3x3mm圆孔)上，自然干燥金属片；

[0029] 7.将上述金属片加入质谱仪中，就会生成质谱；

[0030] 8.外部使用多肽分子质量标准来校正质量精确性，所有样本均进行双份检测以减少实验误差。

[0031] 上述的生物标志是利用一台质谱仪来检测的；该设备的质量精确度约为0.001％。

[0032] 用统计学方法，通过分析血清蛋白指纹峰，发现下述生物标志可以用于区分内、外源性人胰岛素变异表达(表一)。

[0033] 表一、区分内、外源性人胰岛素的案例

[0034]

筛选试验	A组	B组	C组	D组
5807.6460	++	+	++	++
5809.6460	-	-	++	-
5779.6197	-	-	-	++

[0035] 注：A组.100例正常人对照组的血清含内源性胰岛素(5807.6460)；B组.100例糖尿病病人的血清含内源性胰岛素(5807.6460)；C组.100例正常人对照组的血清加入C^{14}同位素内源性胰岛素(5809.6460)；D组.100例正常人对照组的血清加入C^{14}同位素外源性胰岛素(5779.6197)。

[0036] 胰岛素首先能够被具有能与胰岛素结合的抗体吸附表面捕获，非吸附物能从基质上洗脱，吸附到底基的胰岛素在质谱仪中被检测。胰岛素通过离子发生源，如激光，被离子化，产生的离子被一个离子感受集合器收集，然后质量分析器分析那些通过的离子。之后，检测器将检测的离子信息转换为质荷比。定量性控制及质谱激光能量调控：每次测试前，用

质谱的标准化质控血清，将标准化质控血清中用于定量的标准峰6634.0Da强度调至质谱信号强度最大值的50％。胰岛素的检测明显地将与信号强度的检测有关。

[0037] 质谱对待分析物的分析生成飞行时间谱。该飞行时间谱的最终分析并不表示离子化能量攻击一个样本产生的单独的脉冲信号，而是一系列脉冲的信号之和。这样降低了干扰，并增加了动态范围。该飞行时间数据受数据处理软件的影响。软件中数据处理主要包括转换飞行时间与质荷比而产生质谱，降低基线而减少仪器的偏移量，和过滤高频噪音而减轻高频噪音。

[0038] 表二、^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)与环形多肽(Fc-III)结合力实验

[0039]

结合量	^{14}C、^{3}H双同位素标记的环形多肽（Fc-III）组	环形多肽（Fc-III）组
抗人胰岛素抗体	+++	+
抗甲状腺素抗体	+++	+
抗猪胰岛素抗体	+++	+

[0040] 注：实验中采用了等量^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)、环形多肽(Fc-III)。

[0041] 发明中使用的^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)是替代Protein A/G的创新产品，具有特异性、高亲和力地结合抗体；实验数据显示，含^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)结合抗体Fc的能力比环形多肽(Fc-III)高200％；故采用^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)具备创造性和新颖性。

[0042] 本发明可用于体外细胞和非侵入性的体外^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)质谱检测方法的定量控制，检测变异性、修饰性标志物，如内源性胰岛素、外源性胰岛素。

[0043] 本发明中的试剂盒及方法与其他非侵入性的体外检测方法比较，具有以下的特点：

[0044] (1)精确

[0045] 质谱直接分析有很强的精确性。因为蛋白质是由氨基酸组成的，而氨基酸的平均质量是已知的，如果知道了抗原或生物标志的总分子量，那么抗原的变异(指氨基酸变化)就很容易被推测出来。

[0046] (2)方便

[0047] 基质所用的支持物是^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)磁珠等物质，用磁性分离器分离磁珠及样品，无需离心样品。

[0048] (3)快捷

[0049] 用本发明提供的免疫质谱法进行检测时，无需对蛋白质进行测序。本发明采用了抗体-质谱分析对交互作用的修饰蛋白质组的动态变化进行实时检测，如检测变异性的内

源性胰岛素、外源性胰岛素。

具体实施方式

[0050] 本发明将结合具体实施例作进一步说明，这些实例仅用于说明目的，而不用于限制本发明的范围。

[0051] 实施例1

[0052] 本发明提出的^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)的免疫质谱试剂盒实施例1，包括：

[0053] 本发明提出的用于交互作用的修饰蛋白质组的动态变化进行实时检测的免疫质谱试剂盒，其特征在于，该试剂盒包括：

[0054] 一小管含^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)的标准品，10～30μl；

[0055] 一小管含抗胰岛素抗体的、用^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)标记磁珠，30～50μl：

[0056] 一小管缓冲液，300～500μl，该缓冲液为50～100mM PBS，pH值为7.0～8.0；

[0057] 一小管洗脱液，10～50μl，该洗脱液为1～5％三氟乙酸的水溶液；

[0058] 一小管能量吸收分子饱和溶液，5～10μl，该溶液由能量吸收分子溶解在含30～60％乙腈和0.5～1％三氟乙酸的水溶液中构成，该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种；上述各小管置于4℃冷藏盒中。

[0059] 本发明提出的上述免疫质谱试剂盒制备方法，其特征在于，该方法包括以下步骤：

[0060] ^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)的标准品的制备：

[0061] 用重组DNA技术，将载环形多肽(Fc-III)的基因系列寡核苷酸注入大肠杆菌内，合成时，加入^{14}C、^{2}H同位素-亮氨酸，使合成的环形多肽(Fc-III)带有^{14}C、^{2}H同位素；用质谱测试^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)的标准品分子量为比非标记的内源性环形多肽(Fc-III)多了6Da；所述^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)其化学结构为：D C A W H $L^{(C14、H2)}$G E $L^{(C14、H2)}$V W C T

[0062] 注：链中6、9位合成中加入了同位素^{14}C、^{2}H双标记-亮氨酸($L^{(C14、H2)}$)。

[0063] 同理，用重组DNA技术，将载外源性猪胰岛素的基因系列寡核苷酸注入大肠杆菌内，合成时，加入C^{14}同位素-精氨酸，使合成的外源性猪胰岛素带有C^{14}同位素，用质谱测试C^{14}同位素标记的外源性猪胰岛素的标准品分子量为5779.6197；将载内源性胰岛素的基因系列寡核苷酸注入大肠杆菌内，合成时，加入C^{14}同位素-精氨酸，使合成的内源性胰岛素带有C^{14}同位素，用质谱测试C^{14}同位素标记的内源性胰岛素的标准品分子量为5809.6460。

[0064] 制备含抗胰岛素抗体的磁珠：基质是任何能与抗体选择性或特异性结合的物质。举例说明，^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)选择性或特异性结合抗体的Fc位点。洗去基质未吸附的物质；用Carbodiimide方法(Carbodiimide Method)将带有羧酸基团标记的磁性珠上基质与抗胰岛素抗体的氨基基团结合，或用streptavidin标记的磁性珠上基质与biotin标记的抗胰岛素抗体结合；

[0065] 配制50～100mM PBS(Phosphate-Buffered Saline)，pH值为7.0～8.0缓冲液、配制1～5％三氟乙酸的洗脱液，分别分装成300～500μl小管和10～50μl小管；

[0066] 将能量吸收分子溶解于30～60％乙腈和0.5～1％三氟乙酸的水溶液中，制成能量

吸收分子饱和溶液，并分装成5～10μl小管，该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种；

[0067] 将上述分装好的各小管置于4℃冷藏箱中。

[0068] 实施例2

[0069] 本发明提出的^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)的免疫质谱试剂盒实施例2，包括：

[0070] 一小管含^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)的标准品，10～30μl；

[0071] 一小管含抗胰岛素抗体的、用^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)标记磁珠，30～50μl；

[0072] 一小管缓冲液，300～500μl，该缓冲液为50～100mM PBS，pH值为7.0～8.0；

[0073] 一小管洗脱液，10～50μl，该洗脱液为1～5％三氟乙酸的水溶液；

[0074] 一小管能量吸收分子饱和溶液，5～10μl，该溶液由能量吸收分子溶解在含30～60％乙腈和0.5～1％三氟乙酸的水溶液中构成，该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种；上述各小管置于4℃冷藏盒中。

[0075] 免疫质谱试剂盒检测生物标志的应用实验步骤包括：

[0076] 1.稀释：将生物样品先用缓冲液稀释30～50倍，将样品充分混匀；

[0077] 2.结合：将上述标本100μl加至标有特异性抗体的磁珠的PCR管中，置磁性处理器上，15～25℃孵育20～40分钟，除去液体；

[0078] 3.洗去非特异结合：加100μl缓冲液至已装好磁珠的PCR管，置磁性处理器上孵育1～5分钟，除去液体，重复上述操作两次；

[0079] 4.洗脱：加10μl洗脱液1～5分钟，洗脱标本至上清液；

[0080] 5.离子化：取5μl上清液移至另一个PCR管中，加入5μl能量吸收分子饱和溶液充分混匀；

[0081] 6.取1μl混合溶液加样至质谱专用金属片(有3x3mm圆孔)上，自然干燥金属片；

[0082] 7.将上述金属片加入质谱仪中，就会生成质谱；

[0083] 8.外部使用多肽分子质量标准来校正质量精确性，所有样本均进行双份检测以减少实验误差。

[0084] 上述的生物标志是利用一台质谱仪来检测的；该设备的质量精确度约为0.001％。

[0085] 采用本发明方法制备的试剂盒的应用及效果说明如下：

[0086] 一、材料

[0087] 1.标本来源：A.100例正常人对照组的血清；B.100例糖尿病病人的血清；C.100例正常人对照组的血清加入C^{14}同位素内源性胰岛素；D.100例正常人对照组的血清加入C^{14}同位素外源性胰岛素。

[0088] 2.仪器质量控制：A.人标准化质控血清 B.质谱激光能量调控：每次测试前，用上述标准化质控血清。

[0089] 3.磁珠基质含已标记的抗胰岛素的抗体：将^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)用Carbodiimide方法标记在磁珠上(见Gunn DL，et aI.J ImmunoI Methods.1:381-389，1972)；具有吸附剂功能的^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)与抗体置磁性处理器上，22℃孵育30分钟，除去液体。加100μl缓冲液(50mM PBS，pH 7.0～7.4)至已装好磁珠

的PCR管，置磁性处理器上孵育2分钟，除去液体，重复上述操作两次。

[0090] 二、方法

[0091] 1.样品的收集：全血采集后吸取血清，置于-80℃保存；-80℃冰箱中取出血清样品，置冰盒上融解；以10,000转/分，4℃离心2分钟；取上清液。

[0092] 2.样品的准备：每个吸附剂支持物点需要血清1μl，将血清用缓冲液稀释，将样品充分混匀。

[0093] 3.样品检测：上样，将上述标本100μl加至已装好磁珠-^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)-抗体的PCR管中，置磁性处理器上，22℃孵育30分钟，除去液体。加100μl缓冲液(50mM PBS，pH 7.0～8.0)至已装好磁珠的PCR管，置磁性处理器上孵育2分钟，除去液体，重复上述操作两次。加10μl洗脱液2分钟，洗脱标本至上清液。取5μl上清液移至另一个PCR管中，加入5μl能量吸收分子饱和溶充分混匀，取1μl混合溶液加样至质谱专用金属片(有3x3mm圆孔)上，自然干燥金属片。所有样本均进行双份检测以减少实验误差。

[0094] 4.将上述样品加入质谱中，就会生成飞行时间质谱。外部使用多肽分子质量标准来校正质量精确性。

[0095] 实验结果

[0096] 用统计学方法，通过分析血清蛋白指纹峰，发现下述生物标志可以用于区分内、外源性人胰岛素变异表达(表一)。

[0097] 表一、区分内、外源性人胰岛素案例

[0098]

筛选试验	A组	B组	C组	D组
5807.6460	++	+	++	++
5809.6460	-	-	++	-
5779.6197	-	-	-	++

[0099] 注：A组.100例正常人对照组的血清含内源性胰岛素(5807.6460)；B组.100例糖尿病病人的血清含内源性胰岛素(5807.6460)；C组.100例正常人对照组的血清加入C^{14}同位素内源性胰岛素(5809.6460)；D组.100例正常人对照组的血清加入C^{14}同位素外源性胰岛素(5779.6197)。

[0100] 表二、^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)与环形多肽(Fc-III)结合力实验

[0101]

结合量	^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽（Fc-III）组	环形多肽（Fc-III）组
抗人胰岛素抗体	+++	+
抗甲状腺素抗体	+++	+
抗猪胰岛素抗体	+++	+

[0102] 注：实验中采用了等量^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)、环形多肽(Fc-III)。

[0103] 发明中使用的^{14}C、^{2}H双同位素标记的环形多肽(Fc-III)是替代Protein A/G的创新产品，具有特异性、高亲和力地结合抗体；上述实验数据显示，含^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)结合抗体Fc的能力比环形多肽(Fc-III)高200％；故采用^{14}C、^{2}H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)具备创造性和新颖性。

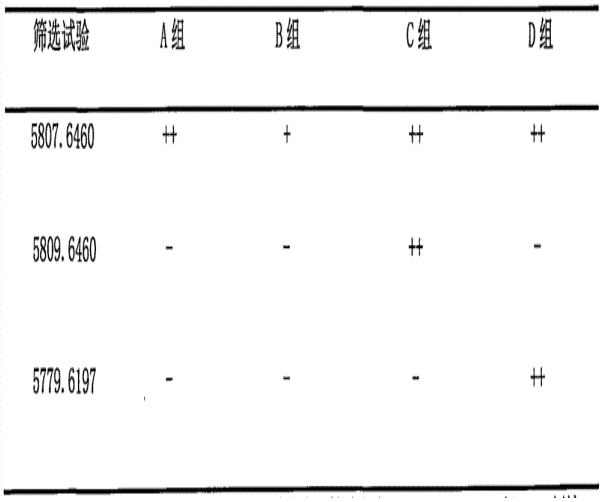
[0104] 在阅读了本发明的上述内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式应当同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0105] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

专利名称(译)	一种微量蛋白质原位检测的免疫质谱试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN106872713A	公开(公告)日	2017-06-20
申请号	CN201611271198.2	申请日	2016-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	许洋		
申请(专利权)人(译)	许洋		
当前申请(专利权)人(译)	许洋		
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/54326		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及微量蛋白质原位检测的免疫质谱试剂盒及制备方法，属于蛋白质检测技术领域，该试剂盒包括一小管含14C、2H同位素双标记的环形多肽(Fc-III)的标准品；一小管含抗标志物抗体的磁珠；一小管缓冲液；一小管洗脱液；一小管能量吸收分子饱和溶液，上述各小管置于4℃冷藏盒中。本发明可用于体外样品检测和预后判断的免疫质谱试剂盒。本方法可以对交互作用的修饰蛋白质组的动态变化进行实时检测。



筛选试验	A组	B组	C组	D组
5807.6460	++	+	++	++
5809.6460	-	-	++	-
5779.6197	-	-	-	++